

ペニシリン結合蛋白質をコードする遺伝子の水平伝播と ラクタム系薬耐性化機構

著者	高畑 祥
号	45
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第737号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60260

たかはた しょう

氏 名（本 籍 地） 高 畑 祥

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農第 737 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 20 年 9 月 11 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

論 文 題 目 ペニシリン結合蛋白質をコードする遺伝子の水平伝播と β -ラクタム系薬耐
性化機構

博士論文審査委員 （主査）教 授 五 味 勝 也

教 授 勝 亦 瞭 一

教 授 伊 藤 義 文

准教授 永 田 裕 二（生命科学研究科）

論文内容要旨

第1章 序論

β -lactam 系薬は、細菌に特異的な細胞壁の生合成酵素の一群であるペニシリン結合蛋白質（penicillin-binding protein: PBP）を阻害することによって抗菌作用を発揮する薬剤である。 β -lactam 系薬は化学構造の違いからペニシリン系薬、セフェム系薬、カルバペネム系薬に大別される。本邦では、呼吸器感染症や尿路感染症（いわゆる市中感染症）に対して特に経口セフェム系薬（cefdinir, cefditoren, cefcapene など）が多く処方されている。また殺菌力に優れたカルバペネム系薬の経口剤の研究開発も進められており、tebipenem のプロドラッグ体が日本において申請中である。

Haemophilus influenzae（インフルエンザ菌）は肺炎や中耳炎などの呼吸器感染症の主要な起炎菌のひとつで、*Neisseria gonorrhoeae*（淋菌）は性感染症（淋病）の原因菌である。これら菌種が引き起こす市中感染症に対しては、通常経口抗菌薬が使用されるが、近年 β -lactam 系薬耐性 *H. influenzae*（ β -lactamase non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*: BLNAR 株）やセフェム系薬耐性 *N. gonorrhoeae* が増加しており、臨床上大きな問題となっている。*H. influenzae* ならびに *N. gonorrhoeae* における β -lactam 系薬耐性化機構は、主に PBP のアミノ酸置換による β -lactam 系薬結合親和性の低下である。*H. influenzae* においては PBP 3 をコードする *ftsI* 遺伝子の変異が、*N. gonorrhoeae* では PBP 2 をコードする *penA* 遺伝子の変異が耐性化に大きく関与することが知られている（Fig. 1）。これら耐性菌の蔓延を防止するためには、耐性菌を選択しにくい薬剤を適正に使用することが重要であり、また製薬企業には耐性菌に対しても有効な新薬を創出することが求められている。そのためには、耐性菌における耐性化機構や伝播様式を理解することが重要である。そこで本研究では、BLNAR 株およびセフェム系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の PBP をコードする遺伝子の変異を詳細に解析して、それら耐性菌における耐性化機構ならびに伝播様式を明らかにすること

を目的とした。

薬剤耐性菌は染色体上の遺伝子に突然変異が導入されることにより、あるいは耐性遺伝子を外来的に獲得することにより生ずる (Table 1)。前者の代表例として、フルオロキノロン耐性菌や rifampicin 耐性結核菌が挙げられる。後者としては、外来性の PBP 2a を獲得した MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、23S rRNA メチラーゼ産生のマクロライド耐性 *Streptococcus pneumoniae*、 β -lactamase 産生グラム陰性菌などが知られている。耐性遺伝子の菌から菌への伝達 (いわゆる水平伝播) には、プラスミドやトランスポゾンなどのモバイルエレメントを介した伝達機構が一般的だが、一部の菌種では形質転換により耐性遺伝子を含む DNA 分子が外部環境中から菌体内に取り込まれ、相同組換えにより耐性遺伝子が染色体上に組み込まれる。

H. influenzae における β -lactam 系薬耐性化は、PBP 3 をコードする *ftsI* 遺伝子への突然変異の蓄積の結果と考えられていたが、*H. influenzae* は形質転換能を有することから、セフェム系薬耐性 *N. gonorrhoeae* や PRSP (penicillin-resistant *S. pneumoniae*) のように外来的に耐性遺伝子を獲得した可能性が考えられた。本研究では、*H. influenzae* において *ftsI* 遺伝子が菌から菌へ伝達されることを初めて見出し、BLNAR 株の出現や本邦における BLNAR 株の蔓延に *ftsI* 遺伝子の水平伝播が関与していることを明らかにした。また、セフェム系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の PBP 2 は、部分的に口腔 *Neisseria* spp. の PBP 2 配列をもち (モザイク PBP 2)、多数のアミノ酸置換が存在した。これまで耐性化に関わるモザイク PBP 2 のアミノ酸置換は不明であったが、本研究ではセフェム系薬耐性化の責任アミノ酸置換を同定した。さらに、薬剤間で耐性菌 (BLNAR 株) を選択する性質ならびに PBP のアミノ酸置換の影響の受けやすさが異なることを見出し、耐性菌蔓延の防止に活用可能なデータが得られた。

第2章 *Haemophilus influenzae* の *ftsI* 遺伝子に関する研究

—菌種間ならびに菌株間における *ftsI* 遺伝子の水平伝播—

本邦では BLNAR 株の増加が臨床上大きな問題となっているが、BLNAR 株の起源や蔓延のメカニズムに関しては、不明な点が多い。本研究より、*H. influenzae* の *ftsI* 遺伝子は菌種を超えて *Haemophilus haemolyticus* との間で、また *H. influenzae* の菌株間で水平伝播していることが示され、*H. influenzae* における *ftsI* 遺伝子の水平伝播が BLNAR 株の出現ならびに本邦における BLNAR 株の蔓延に関与していると考えられた。

1) 菌種間における *ftsI* 遺伝子の水平伝播

臨床分離 *H. influenzae* 621 株の *ftsI* 遺伝子配列を詳細に解析した結果、一部の *ftsI* 遺伝子配列は *H. influenzae* の配列とは部分的に異なるモザイク構造であることが明らかとなった。そのモザイク構造の塩基配列は、既知の *ftsI* 遺伝子配列とは相同性が低く、新規の配列であった。そこで、ヒトを宿主とする *Haemophilus* spp. のうち *ftsI* 遺伝子配列が未同定の 7 菌種について、*ftsI* 遺伝子配列を同定した。既知 *ftsI* 遺伝子配列間で保存された領域に縮重プライマーを設計して、PCR 法にて *ftsI* 遺伝子全長を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、臨床分離 *H. influenzae* で見出されたモザイク構造 *ftsI* 遺伝子は *H. haemolyticus* 由来であることが明らかとなった (Fig. 2)。また臨床分離 *H. haemolyticus* の中にも部分的に *H. influenzae* 由来の *ftsI* 遺伝子配列をもつ菌株 (MSC07286) が存在した。臨床分離株のモザイク *ftsI* 遺伝子の解析より、*H. influenzae* と *H. haemolyticus* 間で *ftsI* 遺伝子の組換えが起こっていることが明らかとなり、*ftsI* 遺伝子は菌種を超えて水平伝播することが示された。

2) 菌株間における *ftsI* 遺伝子の水平伝播

まず分子疫学的な観点から、臨床分離 *H. influenzae* における *ftsI* 遺伝子の水平

伝播の痕跡を探索した。*ftsI* 遺伝子配列が完全に同一の耐性株について、遺伝子型をパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) により同定した。その結果、*ftsI* 遺伝子配列が完全に同一であるにも関わらず、異なる PFGE パターンを示す菌株が複数見出された。分子疫学的には独立した菌株であること、またこれら耐性株における *ftsI* 遺伝子の変異数は非常に多いことを考慮すると、菌株間で *ftsI* 遺伝子が水平伝播した可能性が考えられた。

続いて、実際に *H. influenzae* の *ftsI* 遺伝子が菌から菌へ伝達されるかを実験的に検証するため、試験管内で BLNAR 株 (MSC06647, MSC06651, MSC06663) と感受性菌である Rd 株の rifampicin 耐性クローン (Rd^{RIF}) を混合培養して、BLNAR 株から感受性菌に変異 *ftsI* 遺伝子が伝達される頻度を測定した。その結果、変異 *ftsI* 遺伝子が伝達されたと考えられる rifampicin ならびに cefdinir 耐性クローンが $5.1 \times 10^{-7} \sim 1.5 \times 10^{-6}$ と高率に選択されることが明らかとなった (Table 2)。また DNase I 添加によりそれら耐性クローンは消失したことから、変異 *ftsI* 遺伝子の伝達には形質転換が関与していることが示唆された。混合培養実験で得られた耐性クローンは *ftsI* 遺伝子配列、薬剤感受性、PFGE 法による遺伝子型同定より、BLNAR 株の変異 *ftsI* 遺伝子が Rd^{RIF} に伝達されたクローンであることが確かめられた。

以上、疫学的検討ならびに試験管内における混合培養実験より、*H. influenzae* 菌株間で *ftsI* 遺伝子が高頻度に伝達されることを初めて見出した。

第3章 *Haemophilus influenzae* の *ftsI* 遺伝子に関する研究

—試験管内における BLNAR 株選択頻度の薬剤間比較—

試験管内で BLNAR 株と感受性菌を混合培養すると、高頻度に BLNAR 株から感受性菌に変異 *ftsI* 遺伝子が伝達されることが明らかとなった。そこで本試験系を用いて代表的な経口 β -lactam 系薬について耐性クローン (すなわち BLNAR 株)

の選択頻度を比較した (Fig. 3)。日本の主要な BLNAR タイプである MSC06663 を供与菌として用いた場合、セフェム系薬の多くは BLNAR 株を選択する濃度範囲が広域で、かつ BLNAR 株の選択を完全に抑制する濃度が高いことが明らかとなった。一方、ペニシリン系薬の ampicillin, amoxicillin およびカルバペネム系薬の tebipenem は耐性クローンを選択する濃度範囲が狭く、BLNAR 株を選択しにくい性質をもつことが示された。測定した薬剤の中では、cefditoren と tebipenem が最も低い濃度 (0.5 µg/ml) で変異 *ftsI* 遺伝子の伝播を介した BLNAR 株選択を完全に抑制した。

第 4 章 *Neisseria gonorrhoeae* の *penA* 遺伝子に関する研究

—セフェム系薬耐性に関わるモザイク PBP 2 のアミノ酸置換の同定—

N. gonorrhoeae におけるβ-lactam 系薬耐性化には、PBP 1, PBP 2, porin のアミノ酸置換の関与が報告されており、本邦では口腔 *Neisseria* spp. の *penA* 遺伝子を部分的に獲得したモザイク PBP 2 を保有する耐性菌が増加している。そこで臨床分離 *N. gonorrhoeae* 58 株について PBP 1, PBP 2, porin をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、β-lactam 系薬感受性との関連を解析した。その結果、β-lactam 系薬に対する耐性度は PBP のアミノ酸置換と強く相関することが明らかとなった。セフェム系薬感受性はモザイク PBP 2 保有株で著しく低下しており (Fig. 4)、cefixime をはじめ多くの経口セフェム系薬の抗菌活性はモザイク PBP 2 の影響を強く受けることが明らかとなった。また同じセフェム系薬であっても、3 位側鎖にヘテロ環を有する ceftriaxone および cefditoren はモザイク PBP 2 の影響を受けにくいことが示された。

モザイク PBP 2 において cefixime 低感受性化に関わるアミノ酸置換を同定するため、cefixime 低感受性菌 (MSC02236 株) のモザイク PBP 2 をコードする *penA* 遺伝子を受容性菌 FA1090 に形質転換した。モザイク PBP 2 由来のアミノ酸置換

を有する様々な相同組換え体の薬剤感受性より (Fig. 5)、5 箇所のアミノ酸置換 (F504L, A510V, N512Y, H541N, G545S) を含む 504 番から 545 番残基の領域がセフェム系薬耐性に必須であると考えられた。また、312 番から 322 番残基に存在する 2 箇所のアミノ酸置換 (I312M および V316T) はセフェム系薬に対する耐性を 4 倍上昇させる可能性が示唆された。

点変異導入法により、5 箇所のアミノ酸置換 (F504L, A510V, N512Y, H541N, G545S) をコードする変異をそれぞれ FA1090 由来の *penA* 遺伝子に導入した。それらの形質転換により G545S を有する PBP 2 相同組換え体のみが選択されたことから、G545S がモザイク PBP 2 における必須のアミノ酸置換であることが示唆された。G545S に加えて、I312M または V316T のアミノ酸置換を保有する PBP 2 相同組換え体を取得した。それらの薬剤感受性から、G545S の置換によりセフェム系薬の MIC は 2~4 倍上昇することが明らかとなり、G545S に I312M または V316T のアミノ酸置換が加わると、cefixime, ceftibuten, cefpodoxime, cefdinir など影響を受けやすいセフェム系薬の MIC 値は、さらに 4 倍上昇することが示された (Table 3)。以上のように、モザイク PBP 2 中の 60 余りのアミノ酸置換のうち、cefixime 低感受性化に関与するアミノ酸置換を 3 箇所 (G545S, I312M, V316T) 同定した。

第 5 章 総括

本研究では市中感染症の起因菌で、近年 β -lactam 系薬耐性化が問題となっている *H. influenzae* および *N. gonorrhoeae* を対象菌種として、PBP をコードする遺伝子の水平伝播ならびに β -lactam 系薬耐性化機構について解析を行った。

第 2 章では *H. influenzae* の *ftsI* 遺伝子が近縁菌種間で、また菌株間で水平伝播することを明らかにした。これまで *H. influenzae* では PBP 3 をコードする *ftsI* 遺伝子に突然変異が蓄積することにより感受性菌から BLNAR 株に変貌すると考

えられていたが、*H. influenzae* における変異 *ftsI* 遺伝子の水平伝播の発見により、BLNAR 株の起源が部分的には、*H. haemolyticus* あるいはその近縁菌種であるとする新たなモデルを提唱するに至った。

第3章の *H. influenzae ftsI* 遺伝子の水平伝播における薬剤間比較試験より、経口セフェム系薬の多くは BLNAR 株を選択しやすいこと、またペニシリン系薬は BLNAR 株を選択しにくい性質をもつことが明らかとなり、ペニシリン系薬が第一選択薬で使用する欧米とセフェム系薬が多用される日本における BLNAR 株の分離頻度の違いを科学的に説明し得る実験結果を得た。経口セフェム系薬の中では cefditoren が最も低い濃度で BLNAR 株の選択を完全に抑制することが示され、臨床においても BLNAR 株を選択する可能性は低いと考えられた。またペニシリン系薬 (amoxicillin, ampicillin) 同様、世界初の経口カルバペネム系薬となる tebipenem も BLNAR 株を選択しにくい薬剤であることが示された。

第4章では、cefixime 低感受性 *N. gonorrhoeae* のモザイク PBP 2 における責任アミノ酸置換を同定した。モザイク PBP 2 に存在する 60 余りのアミノ酸置換のうち、 β -lactam 系薬耐性に関与するアミノ酸置換として G545S を、セフェム系薬感受性低下に関与するアミノ酸置換として I312M, V316T を同定した。

耐性菌が増加している状況下では、既存抗菌薬を適正に使用し、耐性菌の蔓延を防止することが最優先課題である。そのためには、たとえ同系統の抗菌薬であっても、耐性菌を選択しやすい薬剤と選択しにくい薬剤があることを理解することは重要であり、本研究結果はその理解の一助となる。また新薬開発においても、耐性菌を選択しにくい特性は大きなメリットであり、本研究成果は現在開発中の tebipenem の特徴付けデータとして新薬承認申請にて活用された。

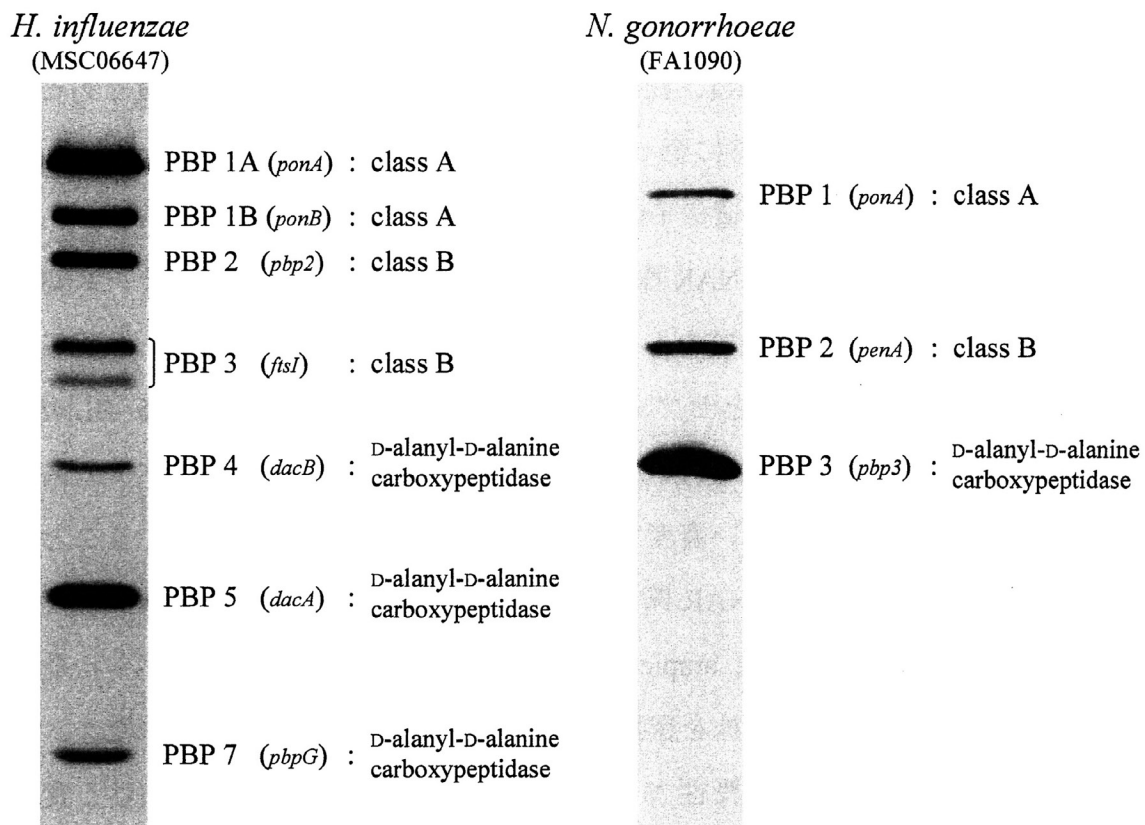


Fig. 1. Penicillin-binding proteins of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria gonorrhoeae*. Membrane fractions were labeled with [³H]benzylpenicillin and separated by SDS-PAGE. PBPs were visualized by autoradiography. PBP 3 of *H. influenzae* and PBP 2 of *N. gonorrhoeae* are the major target molecules of β -lactams. Gene names are shown in parentheses.

Table 1. Three different mechanisms for acquiring the antibiotic resistance in pathogenic bacteria

Mechanisms		Genes	Antibiotics	Bacteria
<i>de novo</i> mutation	chromosomal mutation	<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	fluoroquinolones	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
		<i>rpoB</i>	rifampicin	<i>M. tuberculosis</i>
		<i>ftsI</i> ?	β -lactams	<i>H. influenzae</i> (BLNAR) ?
horizontal gene transfer	mobile element (plasmid, transposon)	SCC <i>mec</i> (<i>mecA</i>)	β -lactams	<i>S. aureus</i> (MRSA)
		<i>ermB</i>	macrolides	<i>S. pneumoniae</i>
		<i>vanA</i>	vancomycin	<i>E. faecium</i> (VRE)
		<i>bla</i>	β -lactams	Gram-negative bacteria
	natural transformation & homologous recombination	<i>pbp1a</i> , <i>2x</i> , <i>2b</i> <i>penA</i>	β -lactams β -lactams	<i>S. pneumoniae</i> (PRSP) <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>

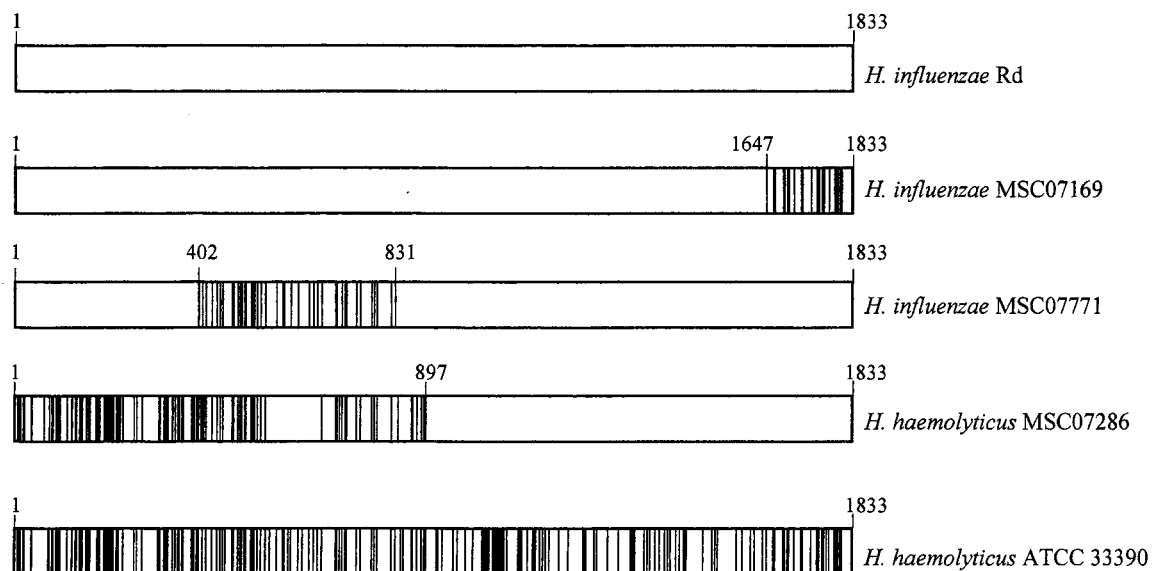


Fig. 2. Schematic representation of the *ftsI* genes of *H. influenzae* and *H. haemolyticus* strains. Mosaic *ftsI* genes from clinical isolates of *H. influenzae* and *H. haemolyticus* are aligned with the standard *ftsI* genes of *H. influenzae* (Rd) and *H. haemolyticus* (ATCC 33390). Solid bars, nucleotides that differ from the corresponding nucleotides in *H. influenzae* strains.

Table 2. Transfer of the *ftsI* genes from BLNAR strains to Rd^{RIF}

Strains (recipient × donor)	Frequency of rifampicin- and cefdinir-resistant cells ^a	
	Without DNase I	With DNase I
Rd ^{RIF} × MSC06647	5.1×10^{-7}	$< 2.6 \times 10^{-8}$
Rd ^{RIF} × MSC06651	1.2×10^{-6}	$< 2.6 \times 10^{-8}$
Rd ^{RIF} × MSC06663	1.5×10^{-6}	$< 2.5 \times 10^{-8}$

^a The averages of three individual experiments are shown.

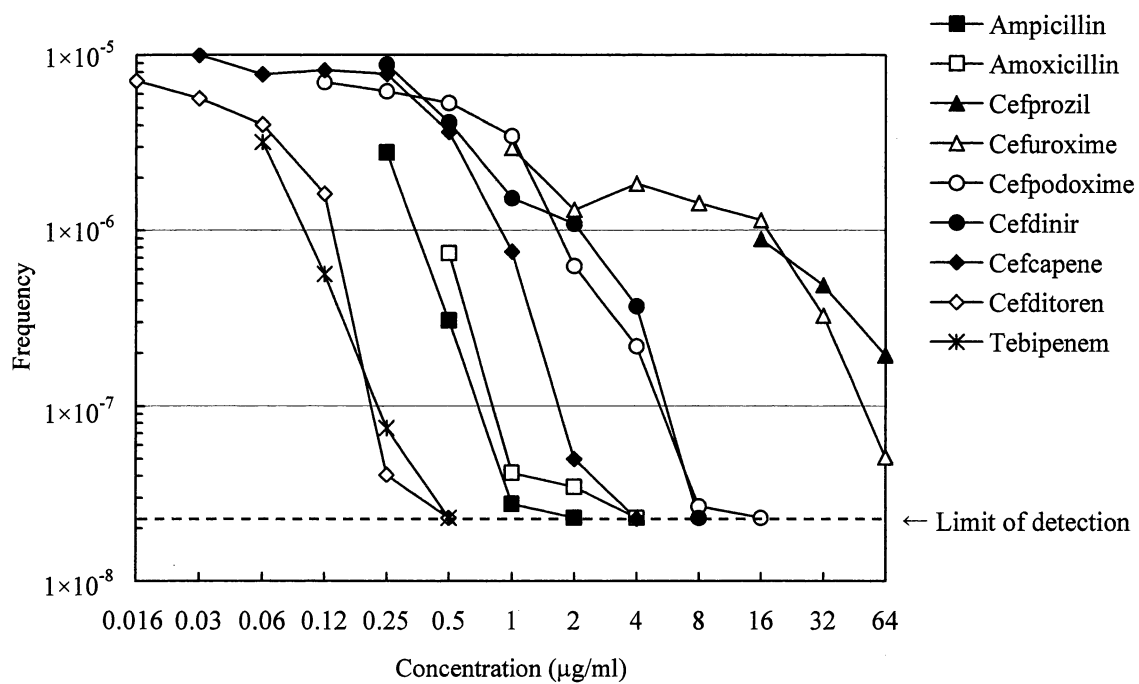


Fig. 3. Frequency of genetic transfer of the *ftsI* gene from the BLNAR strain (MSC06663) to Rd^{RIF} .

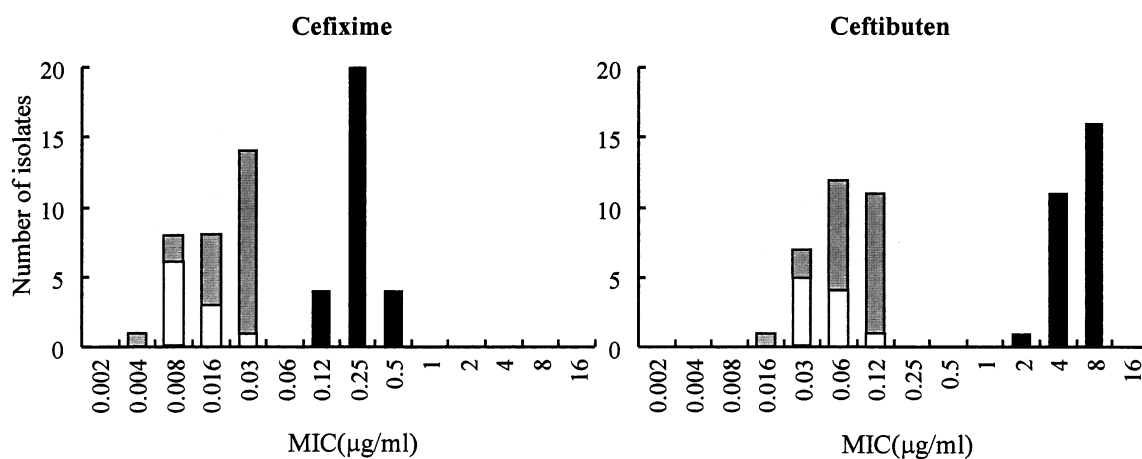


Fig. 4. Susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolates (n=58) to cefixime and ceftibuten.

□; Strains with no mutation in the *pbp* genes (n=10). ▒; Strains with PBP 1(L421P) (n=20).

■; Strains with mosaic PBP 2 (n=28).

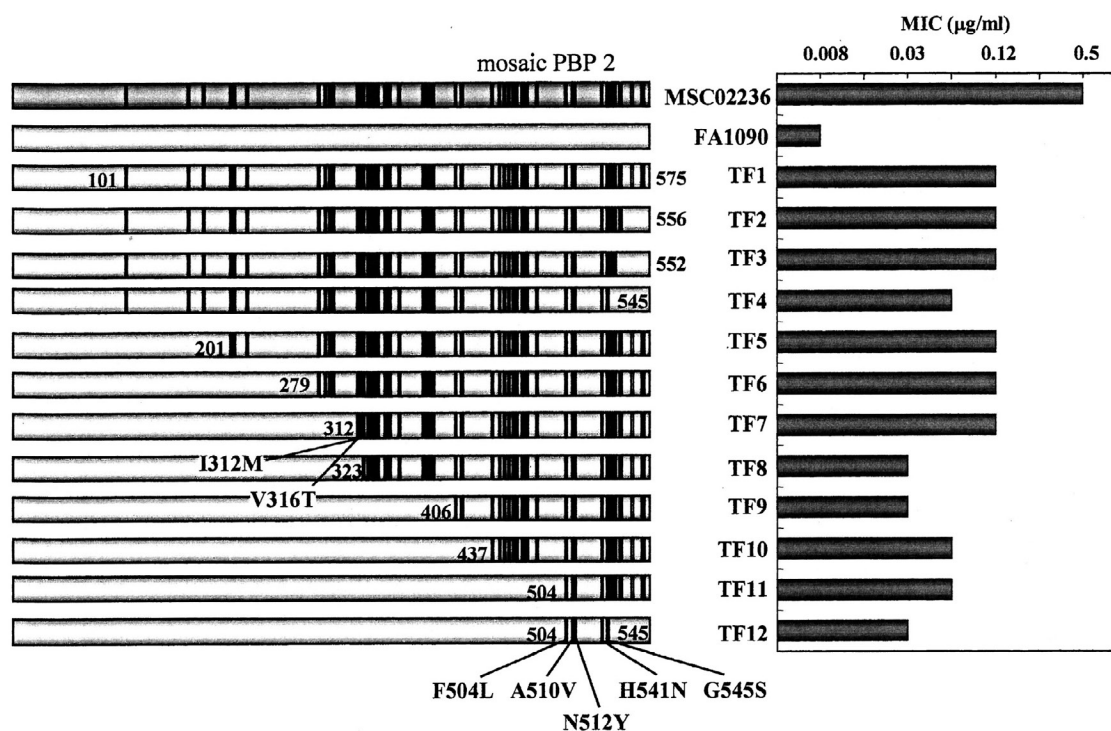


Fig. 5. Schematic representation of PBP 2 and susceptibility to cefixime of various recombinants (TF1 to TF12), along with those of cephem-resistant and -susceptible *N. gonorrhoeae* strain (MSC02236 and FA1090, respectively).

Table 3. MICs of β -lactams for *N. gonorrhoeae* strains with amino acid substitutions in PBP 2

Substitutions in PBP2	MIC (μ g/ml)						
	Penicillin	Ceftriaxone	Cefixime	Ceftibuten	Cefpodoxime	Cefdinir	Cefditoren
None (FA1090)	0.12	0.004	0.008	0.03	0.016	0.016	0.008
G545S	0.12	0.008	0.016	0.12	0.03	0.03	0.016
G545S, I312M	0.12	0.016	0.06	0.5	0.12	0.12	0.03
G545S, V316T	0.06	0.016	0.06	0.5	0.12	0.12	0.03

論文審査結果要旨

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) や *Neisseria gonorrhoeae* (淋菌) による市中感染症に対しては、通常経口抗菌薬が使用されるが、近年これらの菌における β -lactam 系薬剤耐性株が増加しており、臨床上大きな問題となっている。*H. influenzae* や *N. gonorrhoeae* における β -lactam 系薬剤に対する耐性化は、ペニシリン結合タンパク質 (PBP) のアミノ酸置換により β -lactam 系薬剤の結合親和性が低下することが主たる要因である。耐性菌の蔓延を防ぐためには、耐性菌を選択しにくい薬剤を適正に使用することが重要であり、また耐性菌に対して強い抗菌力を発揮する新薬の創出も期待されている。本研究では、これらの薬剤に耐性の *H. influenzae* (BLNAR 株) と *N. gonorrhoeae* の PBP をコードする遺伝子の変異を詳細に解析して、耐性菌の起源や出現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

はじめに、621 株の臨床分離 *H. influenzae* の *ftsI* 遺伝子配列を解析し、一部の配列が部分的に異なるモザイク構造を示すことを認め、他の *Haemophilus* 菌の配列からこれらが *H. haemolyticus* 由来であり、近縁菌種間で *ftsI* 遺伝子の水平伝播が起こっていることを明らかにした。また疫学的検討と試験管内での混合培養実験により、*H. influenzae* の菌株間でも高頻度に水平伝播することを明らかにした。このように、BLNAR 株の起源が部分的には、*H. haemolyticus* あるいはその近縁菌種であるとする新たなモデルを提唱するに至った。また、*H. influenzae* *ftsI* 遺伝子の水平伝播における薬剤間比較試験から、経口セフェム系薬の多くは BLNAR 株を選択しやすいこと、またペニシリン系薬は BLNAR 株を選択しにくい性質をもつことが明らかとなり、ペニシリン系薬が第一選択薬で使われる欧米とセフェム系薬が多用される日本における BLNAR 株の分離頻度の違いを科学的に説明し得る実験結果を得ることができた。

次に、セフェム系薬低感受性 *N. gonorrhoeae* のモザイク PBP 2 における責任アミノ酸置換を点変異導入法により調べ、60 余りのアミノ酸置換のうち、 β -lactam 系薬耐性に関与するアミノ酸置換として G545S を、セフェム系薬感受性低下に寄与するアミノ酸置換として I312M, V316T を同定した。

本研究では、*H. influenzae* において *ftsI* 遺伝子が水平伝播で伝達されることを初めて見出し、耐性株の出現やその蔓延に *ftsI* 遺伝子の水平伝播が関与していることを明らかにした。また、セフェム系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の PBP 2 の薬剤耐性化の責任アミノ酸置換を同定した。耐性菌蔓延の防止に活用可能なデータや効果的な新薬の開発に向けた有用な指針が得られており、審査員一同は本論文提出者に対し、博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。